

Contribución de los polimorfismos en *IFNG* y *TNF* a las complicaciones de los pacientes sometidos a un trasplante alogénico de células progenitoras hematopoyéticas relacionado

Contribution of polymorphisms in *IFNG* and *TNF* to complications of the allogeneic hematopoietic stem cell transplantation with sibling donors

Palau V¹, Berro M², Bestach Y¹, Rivas MM², Foncuberta C³, Vitriu A³, Remaggi G⁴, Martínez Rolón J⁴, Jaimovich G⁵, Requejo A⁵, Padros K⁶, Rodríguez MB⁶, Kusminsky G², Larripa I¹, Belli C¹.

¹Laboratorio de Genética Hematológica, IMEX-CONICET/ Academia Nacional de Medicina, CABA, Argentina,

²Unidad de Trasplante Hematopoyético

Hospital Universitario Austral, Pilar, Argentina,

³Unidad de Trasplante Hematopoyético,

Instituto Alexander Fleming, CABA, Argentina,

⁴Unidad de Trasplante Hematopoyético, FUNDALEU, Argentina,

⁵Unidad de Trasplante Hematopoyético, Fundación Favaloro, CABA, Argentina,

⁶Primer Centro Argentino de Inmunogenética (PRICAI), CABA, Argentina.

Trabajo presentado en sesión plenaria a premio en marco del XXIII Congreso Argentino de Hematología.

virpalau@hotmail.com

Fecha recepción: 05/03/2018

Fecha aprobación:



ARTÍCULO ORIGINAL

HEMATOLOGÍA
Volumen 22 n° 1:
Enero - Abril 2018

Palabras claves: trasplante alogénico de células progenitoras hematopoyéticas, *IFNG*, *TNF*, polimorfismos.

Keywords: hematopoietic stem cell transplantation, *IFNG*, *TNF*, polymorphisms.

Resumen

Las complicaciones del trasplante alogénico de células progenitoras hematopoyéticas (TACPH) relacionado incluyen tiempos variables de *engraftment*, enfermedad injerto contra huésped (EICH), infec-

ciones bacterianas y reactivación de citomegalovirus (CMV), entre otras. La existencia de polimorfismos en genes no HLA que codifican citoquinas proinflamatorias tales como el factor de necrosis tumoral

alfa (TNF) e interferón gamma (IFNG) condicionaría la aparición de estas complicaciones. Se evaluó el impacto de la variante +1349 CAn del gen *INFG* y del polimorfismo -308 G/A de *TNF* en el *engraftment* y en la EICH en 148 receptores de TACPH realizados en los centros participantes. Con respecto al *engraftment* tardío (≥ 15 días), el análisis multivariado confirmó el poder predictivo desfavorable del genotipo CAno12/no12 (baja producción) de IFNG (OR 3,9; $p=0,003$), médula ósea (MO) como fuente de células progenitoras (OR 4,6; $p=0,013$) y bacteriemia (OR 3,0; $p=0,033$). En relación a EICHa 3-4, las variables independientes fueron el genotipo de baja producción de IFNG (OR 0,1; $p=0,008$), bac-

teriemia (OR 3,3; $p=0,048$) y presencia de CMV (OR 3,3; $p=0,046$). Y con respecto a EICHc, el riesgo fue influenciado por el genotipo -308 GG (producción baja) de *TNF* (OR 3,3; $p=0,038$), SP como fuente (OR 5,0; $p=0,028$), acondicionamiento mioablativo (OR 3,3; $p=0,014$) y antecedente de EICHa 2-4 (OR 2,6; $p=0,029$). Aunque es necesario confirmar estos hallazgos, el genotipo de baja producción de IFNG se asoció con *engraftment* tardío y menor EICHa, mientras que los genotipos de baja producción de TNF se relacionaron con mayor incidencia de EICHc. Las variantes polimórficas estudiadas contribuirían al desarrollo de complicaciones en pacientes con TACPH relacionado.

Abstract

Complications of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT) include variable *engraftment* times, acute (aGVHD) and chronic (cGVHD) graft-versus-host diseases, bacterial infections and reactivation of cytomegalovirus (CMV), among others. The existence of polymorphisms in non-HLA genes that encode pro-inflammatory cytokines such as tumor necrosis factor alpha (*TNF*) and interferon gamma (*IFNG*) would condition the appearance of these complications. The impact of polymorphic variants +1349 CAn of *INFG* gene and -308 G/A of *TNF* was evaluated on the *engraftment* and GVHD in 148 allo-HSCT recipients with sibling donors. In the multivariate analysis, the genotype CAno12/no12 (low production) of *INFG* (OR 3.9, $p=0.003$), bone marrow (BM) as source of progenitor cells (OR 4.6, $p=0.013$) and bacteremia (OR

3.0, $p=0.033$) maintained their predictive power with respect to late *engraftment* (≥ 15 days). Genotype of low IFNG production (OR 0.1, $p=0.008$), bacteremia (OR 3.3, $p=0.048$) and presence of CMV (OR 3.3, $p=0.046$) showed a significant association with aGVHD 3-4. And with respect to cGVHD, the genotype -308 GG (low production) of *TNF* (OR 3.3, $p=0.038$), PB as source (OR 5.0, $p=0.028$), myeloablative conditioning (OR 3.3, $p=0.014$) and previous aGVHD 2-4 (OR 2.6, $p=0.029$). Although it is necessary to confirm these findings, the genotype of lower IFNG production was associated with a later *engraftment* and less severe aGVHD and genotypes of lower TNF production was related to a higher incidence of cGVHD contributing to the development of complications in allo-HSCT.

Introducción

El trasplante alogénico de células progenitoras hematopoyéticas (TACPH) es una modalidad terapéutica con potencial curativo que ha permitido incrementar la sobrevida de pacientes con patologías hematológicas. Este potencial curativo se basa fundamentalmente en el reemplazo del sistema hematopoyético del huésped por el del donante y la acción anti-tumoral *per se* del injerto. Aunque los resultados han mejorado considerablemente a lo largo de los años gracias a cambios en los regíme-

nes de acondicionamiento e inmunosupresión y una mejora significativa en el cuidado post trasplante, este procedimiento se halla asociado a una alta morbi-mortalidad. Las complicaciones inherentes incluyen, entre otras, tiempos variables de *engraftment* y la enfermedad injerto contra huésped tanto aguda (EICHa) como crónica (EICHc)⁽¹⁻³⁾.

Durante la etapa de acondicionamiento se produce una “tormenta de citoquinas” a partir de células T activadas y *natural killer* dañando los tejidos blan-

co. La liberación de citoquinas pro-inflamatorias tipo T-helper 1 (Th1) incluye a interferón gamma (IFN- γ) y al factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), afectando la respuesta inmune a la infección o el alo reconocimiento⁽²⁻⁷⁾. Los genes que codifican para ambas citoquinas poseen polimorfismos que modulan su producción: el polimorfismo de nucleótido simple (SNP) -308 G/A *TNF*, ubicado en su región promotora, y la variante de repetición CA presente en el primer intrón de *IFNG*⁽⁸⁻¹⁰⁾.

Estas variantes y otras características inherentes al paciente junto a otros factores relacionados al procedimiento pueden incrementar el riesgo y la seve-

ridad de las complicaciones que surgen luego de la intervención^(1-7,11). Por lo tanto, nuestro objetivo fue valorar el impacto de estas variantes polimórficas en el *engraftment* y en la incidencia y severidad de la EICH.

Material y métodos

Se analizaron retrospectivamente 148 receptores de TACPH relacionados realizados en los centros participantes entre 01-2000 y 03-2015, con una mediana de seguimiento de 4,4 años. Las características principales de la cohorte se detallan en la **tabla 1**.

Tabla 1. Características de la cohorte		N (%)
Edad	(media, rango), años	33 (1-64)
	<16 años / \geq 16 años	17 (11,5) / 131 (88,5)
Género	Femenino / Masculino	59 (39,9) / 89 (60,1)
Fuente	CMSP / MO	125 (84,5) / 23 (15,5)
Enfermedad de base	Mieloide vs no mieloide	77 (52,0) / 71 (48)
Estadio	Temprano / Tardío	63 (47,0) / 71 (53,0)
Régimen de acondicionamiento	Mieloablativo / Intensidad reducida	53 (35,8) / 95 (64,2)
<i>Engraftment</i>	<15 días / \geq 15 días	90 (63,4%) / 52 (36,6%)
EICH agudo	Grados 0-1 / 2 / 3-4	90 (62,9) / 34 (24,5) / 19 (13,3)
EICH crónico	No / Sí	90 (62,5) / 54 (37,5)
Bacteriemia	No / Sí	110 (74,3) / 38 (25,7)
CMV	No / Sí	51 (38,9) / 80 (61,1)

EICH: enfermedad injerto contra huésped; **CMV:** citomegalovirus;

CMSP: células madre de sangre periférica, **MO:** médula ósea

El presente trabajo cuenta con la aprobación de los Comités de Ética de los Institutos de la Academia Nacional de Medicina y del Hospital Universitario Austral.

Para el análisis de las variantes polimórficas se utilizó ADN obtenido de muestras pre-trasplante almacenadas empleadas para estudios de HLA. La variante de repetición +1349 (CA)_n de *IFNG* (*rs3138557*) se estudió según la metodología descrita previamente por Dufour et al, 2004⁽⁸⁾. El SNP-308 G/A de *TNF* (*rs1800629*) se estudió mediante *High Resolution Melting* (HRM) utilizando oligonucleótidos previamente publicados⁽⁹⁻¹⁰⁾.

El análisis estadístico fue realizado utilizando SPSS versión 24.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA). El test exacto de Fisher fue utilizado para el análisis estadístico de variables categóricas. Modelos de regresión logística según el método *Forward Wald* fueron utilizados para el análisis multivariado en los cuales se incluyeron factores que mostraron un nivel de significancia estadística $p < 0,2$ previamente. Los resultados se expresaron conforme a la razón de las razones (*odds ratio*: OR) y sus respectivos intervalos de confianza (IC) 95%. El nivel de significancia estadística fue establecido en $p < 0,05$ y la tendencia entre 0,05-0,1.

Resultados

Al evaluar los pacientes con respecto al *engraftment* (≥ 15 vs < 15 días) (Tabla 1), el genotipo CAno12/no12 (baja producción) de IFNG (27/46, 59% vs 24/75, 32%; $p=0,005$), médula ósea como fuente (14/52, 27% vs 8/90, 9%; $p=0,007$) y bacteriemia (19/52, 36% vs 17/90, 19%; $p=0,027$) se asociaron significativamente con *engraftment* tardío. Estos factores mantuvieron su independencia en el análisis multivariado (OR 3,9, $p=0,003$; OR 4,6, $p=0,013$; OR 3,0, $p=0,033$, respectivamente). El genotipo GA-AA (alta producción) de *TNF* mostró una tendencia (11/44, 25% vs 9/75, 12%; $p=0,079$), mientras que las restantes variables analizadas no influyeron significativamente (**Figura 1**).

Los parámetros que mostraron una correlación significativa con EICHa severo (grados 3-4) fueron el genotipo CAno12/no12 (baja producción) de *IFNG* (3/18, 17% vs 48/104, 46%; $p=0,021$), bacteriemia (9/19, 47% vs 25/124, 20%; $p=0,018$) y presencia de CMV (11/17, 65% vs 39/110, 35%; $p=0,032$). El análisis multivariado confirmó el rol protector del genotipo asociado a menor producción de IFNG (OR 0,1, $p=0,008$); mientras que, la presencia de bacteriemia (OR 3,3, $p=0,048$) y CMV (OR 3,3, $p=0,046$) incrementarían su riesgo de aparición (**Figura 2**).

Con respecto a la EICHe, el genotipo -308 GA-AA (producción intermedia-alta) de *TNF* (4/47, 9% vs 17/72, 24%; $p=0,048$), acondicionamiento de intensidad reducida (13/54, 24% vs 40/90, 44%; $p=0,020$), *engraftment* tardío (13/50, 26% vs 39/89, 44%; $p=0,045$) y EICH severo (3-4) (27/54, 50% vs 23/86, 27%; $p=0,007$). En el análisis multivariado mantuvieron su poder protector el genotipo de producción intermedia-alta de *TNF*, acondicionamiento de intensidad reducida, agregándose médula ósea como fuente de CPH (OR 0,3, $p=0,038$; OR 0,3, $p=0,014$; OR 0,2, $p=0,028$, respectivamente). Además confirmó el riesgo del antecedente de la EICHa clínicamente significativa (grados 2-4) (OR 2,6, $p=0,029$). La incompatibilidad género donante-receptor mostró una tendencia (32/54, 59% vs 39/90, 43%; $p=0,085$), mientras que el resto de las variables analizadas no se asociaron significativamente (**Figura 3**).

Figura 1

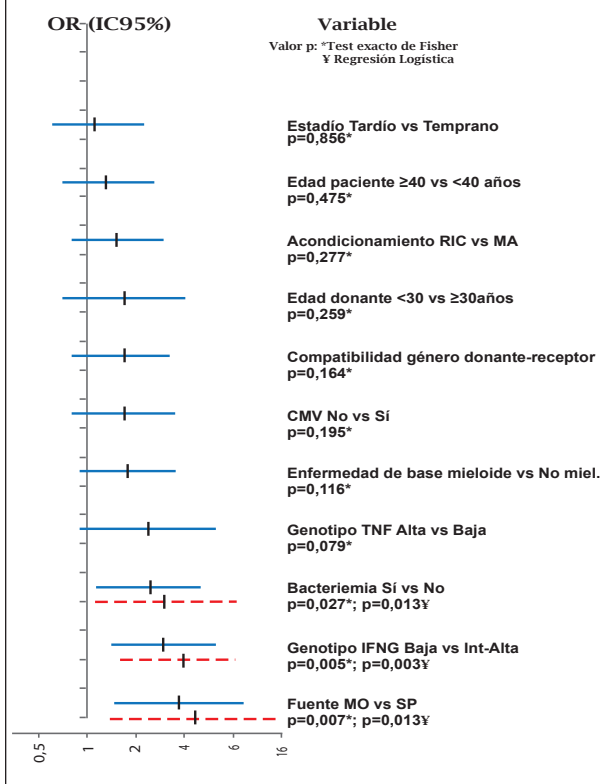


Figura 2

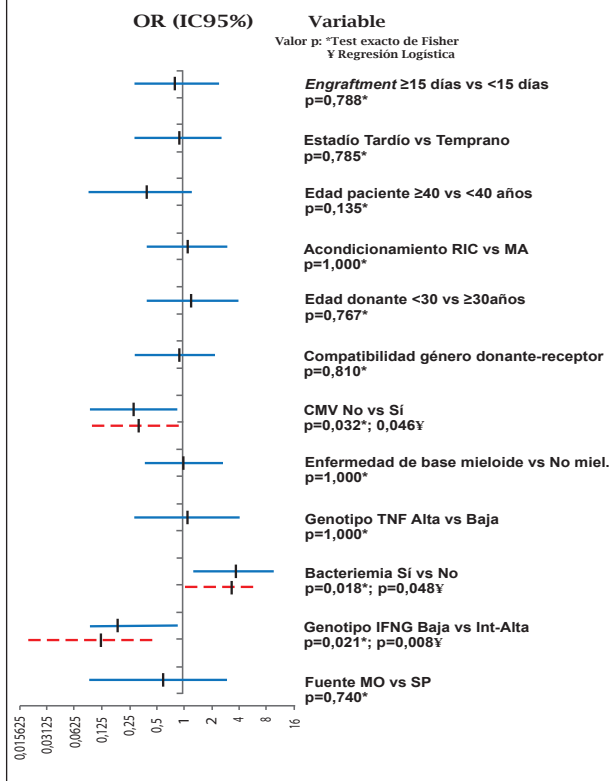
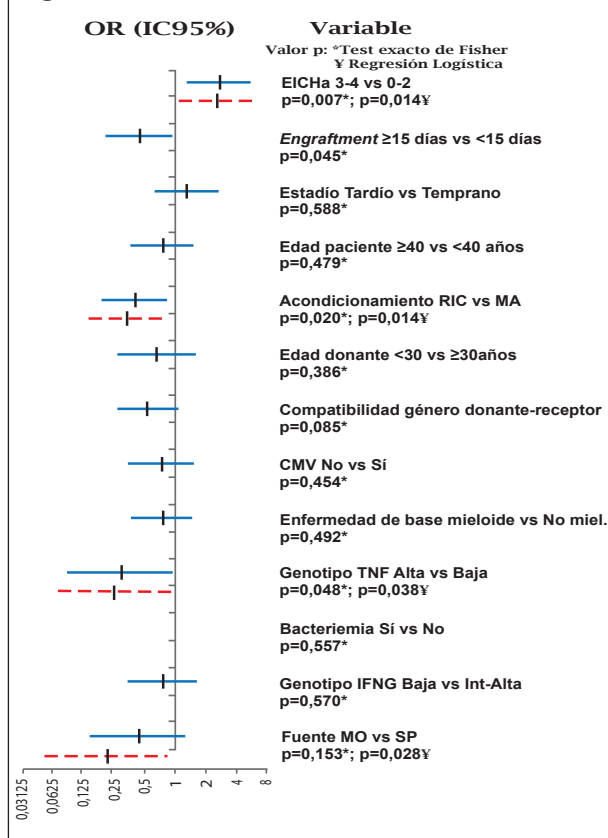


Figura 3



Odds ratio (OR) de los factores en relación a las complicaciones asociadas al trasplante de células madre hematopoyéticas. Figura 1. Engraftment tardío (≥ 15 días). Figura 2. Enfermedad injerto contra huésped agudo. Figura 3. Enfermedad de injerto contra huésped crónico. Los resultados de los OR y de los respectivos intervalos de confianza (IC 95%) se muestran en escala log2. Líneas azules: * test exacto de Fisher; líneas rojas: ‡ regresión logística, método de Forward Wald.

RIC: régimen de intensidad reducida; MA: régimen mielo-ablativo; miel.: mieloide; MO: médula ósea; SP: sangre periférica.

Discusión

En el presente trabajo se evaluó la contribución de variantes polimórficas de los genes *IFNG* y *TNF*, junto a otros parámetros clínicos, en relación con el tiempo de *engraftment* y la incidencia y severidad de la EICH.

El genotipo de menor producción de IFNG se asociaría con un *engraftment* más tardío y menos EICHa severo. Las escasas series publicadas, mayoritariamente provenientes de Polonia, muestran hallazgos contradictorios en relación al impacto de

estas variantes en relación a la EICH^(11,12), sin antecedentes en relación al tiempo de *engraftment*. Previamente hemos observado que este genotipo se asocia a menor sobrevida global relacionada a una mayor tasa de recaída, manteniendo su valor predictivo en aquellos pacientes que recibieron un régimen de acondicionamiento de intensidad reducida⁽¹³⁾. IFN- γ es uno de los principales mediadores de la respuesta Th1, la cual estimula el desarrollo de EICH. Los niveles de IFN- γ se incrementan en las fases tempranas post-TACPH, durante el desarrollo de la EICHa y su expresión puede ser observada en biopsias de las lesiones cutáneas generadas⁽²⁻³⁾. Las variantes genóticas de *TNF*, otra de las citoquinas participantes de la respuesta Th1, no afectarían la aparición de la EICHa, coincidiendo con la mayoría de los estudios previos⁽¹¹⁾. Aunque hay escasos trabajos que evalúan la relación de estas variantes en relación EICHc⁽¹¹⁾, pudimos observar que un genotipo de menor producción de TNF se relacionaría con mayor riesgo. En ciertos fenotipos de EICHc se observa disminución de la actividad de TNF α a expensas de una mayor producción de citoquinas anti-inflamatorias con perfil Th2⁽¹⁴⁾.

Dentro de las restantes variables evaluadas en nuestra serie, pudimos confirmar que la utilización de MO como fuente de CPH se asocia con un *engraftment* más tardío y menor riesgo de EICHc, también observado al utilizar regímenes de acondicionamiento de menor intensidad^(15,16). La compatibilidad de género donante receptor mostró una tendencia a un mayor tiempo de *engraftment* y disminuiría el riesgo de EICHc. Esta compatibilidad desfavorecería el *engraftment* rápido de plaquetas ($\geq 20 \times 10^9/L$ al día 12) en pacientes trasplantados con LMA con SP como fuente⁽¹⁵⁾.

Luego del acondicionamiento, los pacientes son susceptibles a reactivaciones virales, incluyendo al CMV, y a infecciones bacterianas o fúngicas, ya que la reconstitución inmune de las células T es pobre y tardía. La aparición de infecciones bacterianas retrasaría el *engraftment* y sería, al igual que la antigenemia/reactivación de CMV, un factor de riesgo para el desarrollo de EICHa. El tratamiento profiláctico contra la EICH puede favorecer la aparición de infecciones oportunistas o la reactivación viral⁽¹⁷⁾ que, al desencadenarse, requieren ajustes en la terapia inmunosupresora. IFN- γ regula positivamente la expresión de moléculas HLA clase II en las cé-

lulas presentadoras de antígenos, y la presencia del genotipo de baja expresión sería perjudicial en este contexto⁽¹⁸⁾.

Nuestros resultados sugieren que la presencia de estos polimorfismos influye en el desarrollo de las complicaciones relacionadas al TACPH. La detección de las variantes genóticas de estas citoquinas puede ser fácilmente realizada en conjunto a la determinación del perfil HLA de los pacientes y podría ser un parámetro a tomarse en consideración para adaptar las terapias inmunosupresoras en conjunto a otros factores usualmente evaluados.

Declaración de conflictos de interés:

Los autores declaran que no poseen conflictos de interés.

Bibliografía

1. Ballen et al. Selection of optimal alternative graft source: mismatched unrelated donor, umbilical cord blood or haploidentical transplant. *Blood*. 2012; 119:1972-80.
2. Servais S et al. Long-term immune reconstitution and infection burden after mismatched hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2014; 20:507-17.
3. Ogonek J et al. Immune Reconstitution after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Front Immunol*. 2016; 7:507.
4. Coghill JM et al. Effector CD4+ T cells, the cytokines they generate and GVHD: something old and something new. *Blood*. 2011; 117:3268-76.
5. Markey KA et al. The biology of graft-versus-host disease: experimental systems instructing clinical practice. *Blood*. 2014; 124:354-62.
6. Saudemont A, Madrigal JA. Allogeneic T cells: maestro in the co-ordination of the immune response after hematopoietic stem cell transplantation. *Haematologica* 2014; 99:203-5.
7. Dickinson AM, Norden J. Non-HLA genomics: does it have a role in predicting haematopoietic stem cell transplantation outcome? *Int J Immunogenet*. 2015; 42:229-38.
8. Kroeger KM et al. The -308 tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphism effects transcription. *Mol Immunol*. 1997; 34:391-399.
9. Dufour C et al. Homozygosis for (12) CA repeats in the first intron of the human IFN gamma gene is significantly associated with the risk of aplastic anaemia in Caucasian population. *Br J Haematol*. 2004; 126:682-685.
10. Pravica V et al. A single nucleotide polymorphism in the first intron of the human IFN-gamma gene: absolute correlation with a polymorphic CA microsatellite marker of high IFN-gamma production. *Hum Immunol*. 2000; 61:863-6.
11. Hanssen JA et al. Defining genetic risk for GVHD and mortality following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Curr Opin Hematol*. 2010; 17:483-92.
12. Mlynarczewska A et al. Lack of IFN-gamma 2/2 homozygous genotype independently of recipient age and intensity of conditioning regimen influences the risk of aGVHD manifestation after HLA-matched sibling haematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplantation*. 2004; 34:339-44.
13. Palau V et al. Interferon-gamma gene polymorphism associate with mortality and graft-versus-host disease severity in HLA-matched sibling bone marrow transplantation. *Haematologica*. 2016;101 (S1): Abstract 2125.
14. Solano C. EICH crónica y alo-trasplante de progenitores hematopoyético de sangre periférica. XLV Reunión Nacional de la AEHH y XIX Congreso Nacional de la SETH. *Haematologica* (ed. esp.) 2003, supl. 6.
15. Lee H et al. Predictive factors for rapid neutrophil and platelet engraftment after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation in patients with acute leukemia. *Ann Hematol*. 2013; 92:1685-93.
16. Socie G, Blazar B. Acute graft-versus-host disease: from the bench to the bedside. *Blood*. 2009; 114:4327-36.
17. Janeczko M et al. Immune recovery and the risk of CMV/EBV reactivation in children post allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. *Cent Eur J Immunol*. 2016; 41: 287-96.
18. Jaskula et al. Interferon Gamma 13-CA-Repeat Homozygous Genotype and a Low Proportion of CD41 Lymphocytes Are Independent Risk Factors for Cytomegalovirus Reactivation with a High Number of Copies in Hematopoietic Stem Cell Transplantation Recipients. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2009; 15: 1296-1305.